

## PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS PRESENTES EM EXTRATOS NATURAIS

Paulo Henrique Março e Ronei Jesus Poppi\*

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Ieda Spacino Scarminio

Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-970 Londrina – PR, Brasil

Recebido em 19/7/07; aceito em 20/9/07; publicado na web em 2/4/08

ANALYTICAL PROCEDURES FOR IDENTIFYING ANTHOCYANINS IN NATURAL EXTRACTS. Anthocyanins are among the most important plant pigments. Due to their potential benefits for human health, there is considerable interest in these natural pigments. Nonetheless, there is great difficulty in finding a technique that could provide the identification of structurally similar compounds and estimate the number and concentration of the species present. A lot of techniques have been tried to find the best methodology to extract information from these systems. In this paper, a review of the most important procedures is given, from the extraction to the identification of anthocyanins in natural extracts.

Keywords: anthocyanins; analytical procedures; identification.

## INTRODUÇÃO

A cor é um dos mais importantes atributos de qualidade de um alimento, exercendo uma enorme influência em seu valor estético e servindo de base para a aceitação de uma grande variedade de produtos alimentícios por parte dos consumidores.<sup>1</sup> Em produtos naturais, a maioria das substâncias responsáveis pela coloração pertence à classe dos flavonóides. Os flavonóides possuem estrutura marcada pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma  $C_6-C_3-C_6$ , e são divididos em classes dependendo do estado de oxidação do anel central de pirano.<sup>2</sup> A Figura 1 apresenta a estrutura química dos principais tipos de flavonóides.<sup>3</sup>

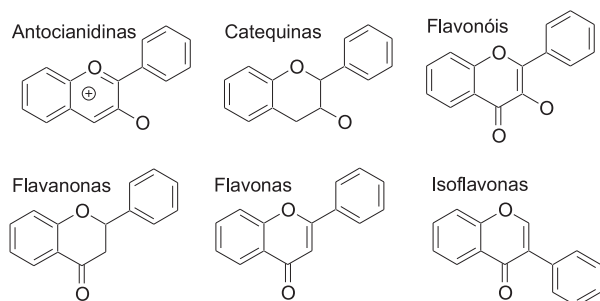


Figura 1. Estrutura química dos principais tipos de flavonóides<sup>3</sup>

A classificação do tipo de flavonóide presente em um extrato de planta baseia-se inicialmente no estudo das propriedades de solubilidade e reações de coloração. Este procedimento é seguido por análise cromatográfica do extrato da planta. Os flavonóides podem ser separados por procedimentos cromatográficos e os componentes individuais identificados, quando possível, por comparação com padrões.

As duas classes de flavonóides consideradas como mais importantes são os flavonóis e as antocianidinas.<sup>4</sup> As antocianidinas apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico<sup>5</sup> (2-fenilbenzopirilium), representado na Figura 2a. A Figura 2b apresenta um exemplo de estrutura de antocianidina, conhecida como cianidina.

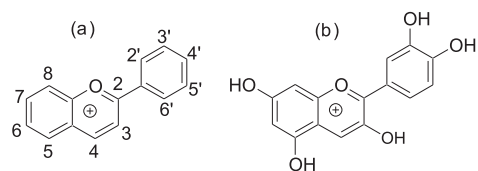


Figura 2. (a) Estrutura do cátion flavílico e (b) estrutura da antocianidina cianidina

Os pigmentos ocorrem geralmente na forma de antocianinas,<sup>6</sup> que são derivadas das antocianidinas. As antocianinas não possuem grupos glicosídeos e a maioria possui hidroxilas nas posições 3, 5 e 7. Já nas antocianinas, uma ou mais destas hidroxilas estão ligadas a açúcares, sendo os mais comuns glicose, xilose, arabinose, rarnnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos, como *p*-coumárico, caféico, fenílico e vanílico. O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, quando comparados com as antocianidinas.<sup>5</sup> A Figura 3 é um exemplo de estrutura de antocianina presente na maioria dos vegetais, a cianidina 3-glicosídeo.

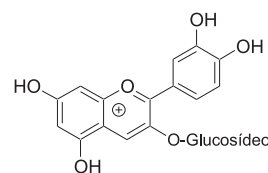


Figura 3. Estrutura da antocianina cianidina 3-glicosídeo

O termo antocianina, derivado do grego de flor e azul (*anthos* = flores; *kianos* = azul), foi inventado por Marquart em 1853 para se referir aos pigmentos azuis das flores. Percebeu-se mais tarde que não apenas a cor azul, mas também várias outras cores observadas em flores, frutos, folhas, caules e raízes são atribuídas a pigmentos quimicamente similares aos que deram origem ao “flor azul”.<sup>7</sup>

Com a mesma origem biossintética dos outros flavonóides na-

\*e-mail: ronei@iqm.unicamp.br

turais, as antocianinas são estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto contendo 15 átomos de carbono na forma  $C_6-C_3-C_6$ , porém, ao contrário dos outros flavonóides, as antocianinas absorvem fortemente na região visível do espectro, conferindo uma infinidade de cores, dependendo do meio de ocorrência.<sup>7</sup>

Devido sua solubilidade em água,<sup>8</sup> as antocianinas ocorrem nos tecidos de plantas dissolvidas no fluido da célula vegetal, que geralmente apresenta pH levemente ácido.<sup>6</sup> As antocianinas mais comumente encontradas em frutas são derivadas principalmente de seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. A nomenclatura dos pigmentos é derivada da fonte (do vegetal) em que eles foram primeiramente isolados.<sup>9</sup> As diferenças entre as várias antocianinas estão no número de grupos hidroxílicos na molécula, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas ligações, bem como na natureza e no número de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados ao(s) açúcar(es) na molécula de antocianina.<sup>1</sup>

Uma característica marcante das antocianinas está no fato de que em soluções aquosas, apresentam diferentes estruturas em função do pH. De modo geral, em meio extremamente ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico ( $AH^+$ ). Para um meio com pH maior que 2, é observado um equilíbrio entre o cátion flavílico e uma estrutura conhecida como pseudobase carbinol (B). Com o aumento do pH, as antocianinas perdem a cor até se tornarem praticamente incolores em pH aproximadamente 6, devido à predominância da espécie pseudobase carbinol. Em valores de pH acima de 6,0, tanto a estrutura pseudobase carbinol quanto anidrobases quinoidais (A) podem formar a espécie cis-chalcona ( $C_C$ ). A formação desta ocorre com a ruptura do anel heterocíclico o que, dependendo do tipo de antocianina, pode tornar a reação irreversível. A formação da cis-chalcona a partir da anidrobases quinoidais pode ocorrer por dois caminhos diferentes: de maneira direta, resultado de um aumento brusco de pH, ou com a formação das espécies anidrobases ionizadas

(A<sup>-</sup>), possivelmente provenientes de um aumento gradual de base entre os valores de pH 6,5 e 9. Ao iniciar-se a ionização das antocianinas, são formadas estruturas de anidrobases que exibem coloração azul. Em meio extremamente alcalino, observa-se o equilíbrio entre formas ionizadas de chalconas cis e trans, apresentando coloração amarelada. Baseando-se em trabalhos anteriores,<sup>10,11</sup> juntamente com estudos recentes, sugere-se que as possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH podem ser representadas pela Figura 4.

O aquecimento é um fator que acelera a degradação das antocianinas. Em presença de cátions de Al, Fe, Sn e outros metais, as antocianinas formam produtos insolúveis que, no caso do alumínio, encontram aplicações como corantes que apresentam estabilidade ao calor, pH e oxigênio superior à das antocianinas livres. Além do pH, a luz é um outro fator de grande importância na alteração da cor das antocianinas. A transformação é mais intensa quando o fator luz é combinado com o efeito do oxigênio. As antocianinas também podem se combinar com  $HSO_3^-$  presente em muitos alimentos formando produtos incolores provenientes da ligação deste com o carbono 4 (Figura 2a) da antocianina. A estabilidade das antocianinas ao descolorimento é aumentada consideravelmente pela presença de ácidos fenólicos. O mesmo efeito é observado pela presença de flavonóides não-antocianínicos, especialmente os flavonóis, como por exemplo a rutina. Compostos como o acetaldeído, amino ácidos, taninos, dentre alguns outros, também conferem aumento na estabilidade da molécula. Esse aumento na estabilidade é atribuído à copigmentação, ou seja, associação entre antocianina e flavonol (copigmento) por ligações de hidrogênio, de modo que o flavonol venha a formar uma estrutura protetora envolvendo a antocianina.<sup>11</sup>

Existe um grande interesse no estudo das antocianinas em diversas áreas, como na saúde, devido ao seu grande potencial terapêutico, na indústria, com destaque para as aplicações na fabricação de vinhos e como corantes naturais,<sup>12</sup> e também na área de ensino em química, onde servem como indicadores de pH.<sup>5,13</sup> No entanto, a

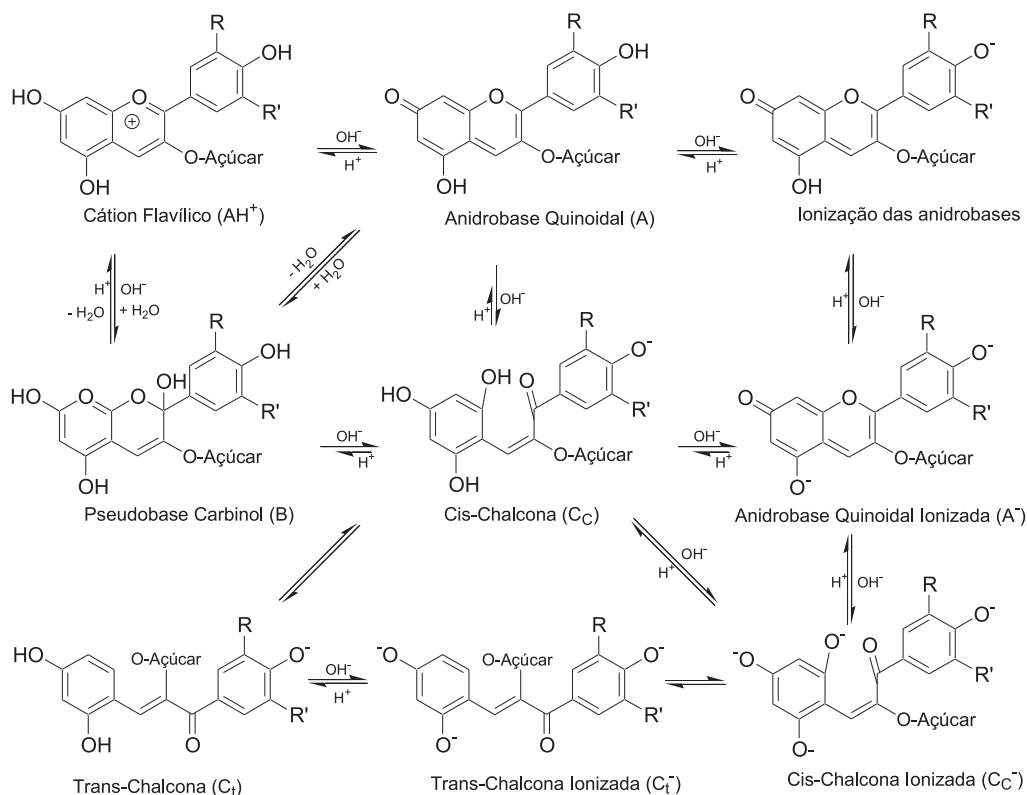


Figura 4. Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH

utilização de antocianinas apresenta restrições em função de limitações, como a disponibilidade de matéria-prima produtora de pigmentos na quantidade e qualidade requerida, as dificuldades envolvendo processos de obtenção (extração, purificação e isolamento), o poder corante reduzido quando comparado aos produtos sintéticos e, principalmente, a baixa estabilidade apresentada pelas antocianinas.<sup>1</sup>

O conhecimento da estrutura dos pigmentos, a influência de fatores como pH, temperatura, a presença de ácidos, açúcares, íons metálicos e de substâncias chamadas de copigmentos assume importância fundamental no estudo da estabilidade de antocianinas, visando seu possível uso em alimentos.<sup>1</sup> A determinação de compostos fenólicos é de grande importância devido à relação destes compostos com as qualidades sensoriais dos alimentos, como cor, sabor e aroma.<sup>14</sup> No entanto, os extratos de plantas apresentam misturas de diferentes substâncias, incluindo diferentes classes de flavonóides. As antocianinas, por exemplo, presentes em pétalas de flores, estão sempre acompanhadas de flavonas incolores que se apresentam como copigmentos, sendo essenciais para a expressão da cor e fornecendo estabilidade à antocianina.<sup>15</sup> O conhecimento do tipo de antocianina também se mostra fundamental no estudo de plantas ornamentais, onde a predominância de uma antocianina individual pode determinar a cor do produto, influenciando diretamente na aceitação e no valor comercial do mesmo.<sup>16</sup> Outra razão para a identificação de antocianinas individuais está na análise de vinhos adulterados: os tipos de antocianinas dependem da espécie do gênero *Vitis* utilizada na fabricação do vinho, e são determinantes da coloração, aroma e, principalmente, do sabor desta bebida.<sup>17</sup>

Como os extratos vegetais são matrizes complexas, às vezes é necessário que se purifique a amostra para realizar a identificação das substâncias presentes. Para o caso de identificação de substâncias individuais, se faz necessária a remoção de substâncias interferentes e a separação de compostos de uma mesma classe, e para estes fins a cromatografia é um método indispensável, possibilitando a posterior identificação e quantificação de compostos, com alta sensibilidade e eficiência.<sup>18</sup>

## METODOLOGIA ANALÍTICA

O estudo de antocianinas presentes em extratos vegetais é dependente do objetivo da análise: a detecção da presença de antocianinas em uma planta pode ser realizada utilizando-se a técnica de cromatografia em papel (CP), baseando-se na propriedade de mudança de cor em função do pH apresentada pelas antocianinas; para fins de identificação de antocianinas individuais, como é o caso de estudos de plantas ornamentais onde a identificação do tipo de antocianina é de fundamental importância, podem ser empregadas técnicas mais avançadas, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN de <sup>1</sup>H) e de carbono (RMN de <sup>13</sup>C), eletroforese capilar por zonas<sup>19</sup> (ECZ – *Capillary Zones Electrophoresis*, CZE), além de equipamentos que combinam estas e outras técnicas (equipamentos hifenados).

Na identificação de um constituinte de uma planta, uma vez que este tenha sido isolado e purificado, é necessário primeiramente determinar a classe do composto e, então, encontrar qual substância em particular está presente dentro desta classe. Para as antocianinas, a classe de compostos pode ser facilmente distinguida por testes de coloração.<sup>15</sup>

Como etapa inicial para o estudo de antocianinas, a detecção da presença do pigmento na amostra pode ser realizada utilizando-se a técnica de cromatografia em papel, onde a presença ou ausência do pigmento antocianina pode ser determinada baseando-se em uma

reação que envolve mudança reversível na coloração em função do pH. Para isso, o primeiro passo é a obtenção do extrato da planta.

As antocianinas são instáveis em soluções com pH neutro ou alcalino, e mesmo em soluções com pH ácido a cor pode desaparecer gradualmente quando a solução sofre exposição à luz. Como estes pigmentos são solúveis em solventes polares, devem ser extraídos utilizando-se soluções alcoólicas de metanol ou etanol contendo ácido acético ou ácido clorídrico. O ácido empregado na solução diminui o pH, prevenindo a degradação de antocianinas não aciladas.<sup>12</sup> A maioria dos estudos emprega soluções alcoólicas de metanol acidificadas com HCl, no entanto, na análise de alimentos a solução de metanol deve ser substituída por etanol, devido à toxicidade do metanol.<sup>20</sup> Após a maceração de quantidade adequada de amostra embebida na solução extratora, pode-se obter um extrato suficientemente concentrado para a aplicação direta em cromatografia em papel.

No caso de necessidade de armazenamento, o extrato deve ser mantido em local escuro e, preferencialmente, a baixas temperaturas.<sup>15</sup>

A cromatografia em papel é uma técnica de separação por partição líquido-líquido: a celulose é constituída por várias unidades de glicose anidra ligadas por átomos de oxigênio, de modo que um líquido polar como a água tem grande afinidade pelas hidroxilas de cada glicose, formando ligações de hidrogênio, ficando retido e funcionando como fase estacionária, e os líquidos menos polares (solventes orgânicos) são repelidos e funcionam como fase móvel.<sup>21</sup> No estudo de antocianinas o solvente mais utilizado é a solução de BAW (butanol - ácido acético - água, na maioria das vezes na proporção 4 : 1 : 5).<sup>22</sup> Como a fase estacionária é um líquido, o processo de separação ocorre por partição, baseando-se nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária.

Após o desenvolvimento cromatográfico, o aparecimento de mancha(s) colorida(s) é o primeiro indicio da possibilidade de existência de antocianinas no extrato.<sup>23</sup> Baseando-se na propriedade apresentada pelas antocianinas de variar a coloração de forma reversível em função do pH,<sup>10,22</sup> é possível detectar se a mancha observada é devido à presença de antocianinas ou outras substâncias, como por exemplo as betacianinas, presentes em beterraba (planta da família *Centrospermae*). As betacianinas são pigmentos solúveis em água e apresentam coloração vermelho-escura quando em meio levemente ácido, o que pode causar grande confusão em uma tentativa inicial de classificação do tipo de pigmento. A principal betacianina é a betanina. No entanto, as antocianinas e as betaninas não ocorrem simultaneamente em uma mesma planta: algumas plantas substituem biossinteticamente as antocianinas por betaninas, como é o caso de plantas da família *Centrospermae*, como cacto (*cacti*), flores do tipo *bougainvillea*, arbustos como os conhecidos como *pokeweed*, *Phytolacca* e algumas plantas ornamentais como rabo de gato (*Amaranthus*).<sup>15</sup> Neste caso, baseando-se na mudança de estruturas decorrentes da variação do pH do meio (Figura 4), ao mudar o pH do cromatograma para levemente alcalino pela exposição a vapores de amônia, a mancha deve mudar de coloração. Devem-se tomar os devidos cuidados para não tornar o meio alcalino a ponto de causar a formação das chalconas ionizadas (ruptura do anel) o que, em alguns casos, torna a reação irreversível. Caso a substância mude de cor, deve-se borrifar solução ácida, revertendo o pH para o valor inicial e, dessa forma, voltando à cor inicial. As betacianinas diferem das antocianinas por serem mais instáveis,<sup>15</sup> de modo que ao mudar o pH para valores mais elevados (de 2 para 7, por exemplo) as betaninas sofrem transformações irreversíveis em sua estrutura, enquanto que as antocianinas retomam a forma inicial.

Para estudos com finalidades apenas de detecção da presença de antocianinas em extratos vegetais, o teste de cromatografia em papel é suficiente. Em estudos com finalidade de identificação de antocianinas

individuais, a cromatografia em papel deve ser encarada apenas como teste preliminar pois, neste caso, existe a necessidade de purificação, melhor separação e isolamento das antocianinas. A cromatografia em camada delgada (CCD) pode ser uma alternativa atraente para a cromatografia em papel, pois fases estacionárias diferentes podem ser empregadas, possibilitando diferentes mecanismos de separação. As principais vantagens da CCD quando comparada à CP são a versatilidade e sensibilidade.<sup>24</sup> No entanto, apesar de um custo mais elevado, as técnicas mais avançadas apresentam melhor eficiência, melhor resolução e resultados mais confiáveis na separação, como é o caso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar por zonas (ECZ) e cromatografia contra-corrente de alta velocidade (CCCAV – *High-speed countercurrent chromatography, HSCCC*).

Vários métodos têm sido utilizados com sucesso para a purificação dos extratos brutos de antocianinas, contudo, o método mais utilizado atualmente é a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*) em cartuchos C<sub>18</sub> e Sephadex. Isto se deve à simplicidade relativa para eliminação das impurezas, tais como substâncias polares e não fenólicas. O procedimento para purificação das antocianinas envolve a aplicação do extrato antociânico bruto no cartucho contendo material sorvente, seguido da eluição dos componentes individuais com solventes apropriados. As antocianinas ficam fortemente ligadas aos adsorventes por seus grupos hidroxil não-substituídos. Desta forma, primeiramente são eluídas as substâncias mais polares que as antocianinas, tais como açúcares, ácidos e substâncias solúveis, e posteriormente são eluídos os pigmentos antociânicos.<sup>3,12,25,26</sup>

Para a separação das antocianinas, técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia contra-corrente (CCC)<sup>18</sup> e eletroforese capilar por zonas (ECZ)<sup>27</sup> têm sido as mais utilizadas. A cromatografia em papel e a cromatografia em camada delgada também podem ser utilizadas na etapa de separação, no entanto, não oferecem nenhuma outra vantagem além do custo quando comparadas com, por exemplo, a eficiência de separação apresentada por CLAE e ECZ. Quando se trabalha com grandes quantidades de extrato, uma alternativa é a cromatografia em coluna aberta.

Atualmente, a técnica mais utilizada, e uma das principais, para separação de antocianinas é a CLAE com fase reversa. Este tipo de cromatografia utiliza instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas fechadas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída a altas pressões, apresentando a capacidade de realizar separações de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Além de permitir excelente separação, esta técnica possibilita simultaneamente separar, identificar e quantificar pigmentos antociânicos sem requerer purificação excessiva dos extratos.<sup>25</sup>

Uma outra técnica que pode ser empregada na separação de antocianinas é a cromatografia contra-corrente de alta velocidade (HSCCC), descrita como um processo de separação no qual uma fase líquida é retida no espiral da coluna por força centrífuga, enquanto uma segunda fase líquida imiscível passa continuamente por ela. Por se tratar de uma técnica de suporte-livre líquido-líquido, a retenção dos solutos é determinada exclusivamente por seus coeficientes de partição, e o problema da adsorção dos solutos na fase estacionária é eliminado.<sup>28</sup> Segundo alguns autores,<sup>29-31</sup> as maiores vantagens desta técnica de separação quando comparadas com CLAE preparativa são as menores quantidades de fase móvel requeridas, a não adsorção dos analitos (compostos de interesse) na fase estacionária e a completa recuperação da amostra. No entanto, a CLAE apresenta melhor resolução e menor tempo de análise que a técnica de HSCCC.

As antocianinas encontradas na natureza são móveis em um campo elétrico. Baseando-se neste fato, a eletroforese capilar, que é uma

ferramenta analítica relativamente nova, também pode ser utilizada na separação de antocianinas.<sup>3</sup> Em 2003, Sáenz-López *et al.*<sup>27</sup> desenvolveram um método utilizando CZE para determinação de antocianinas em vinho, mostrando que a técnica pode ser uma ferramenta muito útil para análise de antocianinas. Recentemente, o mesmo grupo fez uma seqüência de estudos sobre antocianinas, tais como ordem de migração de antocianinas em vinhos<sup>32</sup> e análise de vinho envelhecido<sup>33</sup> utilizando CZE. A eletroforese capilar tem como vantagens alta sensibilidade, alta resolução, baixo consumo de amostra e geração mínima de resíduos. No entanto, quando comparada à CLAE, apresenta menor sensibilidade e menor eficiência na separação<sup>34</sup> de antocianinas em amostras complexas, o que deve ser o fator limitante, resultando na baixa quantidade de trabalhos publicados utilizando esta técnica para a separação de antocianinas.

A cromatografia gasosa é outra técnica que pode ser empregada na separação de antocianinas. Nesta técnica, a separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária sólida ou líquida e uma fase móvel gasosa. De acordo com o tipo de fase estacionária utilizada, a cromatografia gasosa pode ser classificada em cromatografia gás-sólido, cromatografia de fase ligada e cromatografia gás-líquido, sendo esta última a forma mais utilizada de cromatografia gasosa. Esta técnica é mais utilizada para a separação de gases ou substâncias voláteis,<sup>21</sup> no entanto, devido ao fato das antocianinas não apresentarem volatilidade, existe a necessidade de derivatização dos pigmentos, processo que dificulta o uso desta técnica.

As técnicas de hidrólise podem servir como um complemento para a identificação de antocianinas, auxiliando na separação das antocianinas de seus açúcares e ácidos ligados. A hidrólise ácida geralmente é realizada com ácido clorídrico concentrado em temperaturas relativamente altas, provocando a ruptura das ligações glicosídicas, levando ao aparecimento dos açúcares e suas antocianidinas. As antocianidinas e os açúcares podem, então, ser identificados por técnicas como cromatografia em papel. Para a identificação das antocianidinas é desejável a comparação com padrões. No caso da hidrólise alcalina, é provocada a ruptura entre as ligações dos grupos acil. A análise desses grupos pode ser realizada após a extração do solvente por técnicas como espectroscopia e cromatografia.<sup>25</sup>

Uma vez separadas e purificadas, as antocianinas podem ser identificadas por várias técnicas, sendo que as mais utilizadas são a espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN <sup>13</sup>C) e de próton (RMN <sup>1</sup>H), e espectrometria de massas (MS), que, na maioria das vezes, aparece combinada com CLAE. A introdução dos sistemas de detecção por arranjo de diodos (DAD) e sua utilização quando acoplado com CLAE abrem novas perspectivas para a separação, identificação e quantificação de antocianinas, devido à possibilidade de se obter espectros completos na região ultravioleta/visível durante as análises cromatográficas. Os métodos de detecção e identificação de antocianinas além das técnicas de espectrofotometria UV-Vis, podem envolver sistemas de detecção de espectrometria de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN).<sup>25</sup>

Para a identificação das antocianinas em alimentos e plantas podem ser utilizados dois procedimentos: comparação direta, quando há disponibilidade de padrões, ou comparação indireta, se não houver material padrão. Neste caso, segundo Harborne,<sup>15</sup> uma comparação cuidadosa com dados da literatura pode ser aceitável. A comparação indireta, embora seja um método sujeito a erros, é justificada pela falta de padrões e pelo longo e trabalhoso procedimento para identificação. No caso de uma nova espécie, o uso de técnicas como CLAE, RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>1</sup>H, MS, além da combinação destas técnicas, podem fornecer informações que ajudam na caracterização do pigmento. A técnica de CLAE está na grande maioria das vezes apenas na

etapa de separação, pois existe uma grande dificuldade na identificação de antocianinas, não apenas em CLAE, mas em todas as outras técnicas, devido à falta de padrões de pigmentos antocianínicos.

Com o intuito de minimizar a dificuldade da falta de padrões e dos trabalhosos procedimentos para a identificação de antocianinas, em 1999, Goiffon *et al.*<sup>35</sup> propuseram um método para identificação baseado nos parâmetros que afetam a retenção da cromatografia líquida. Na metodologia proposta, os autores relacionam o tempo de retenção de várias antocianinas com o tempo de retenção de uma antocianina que está presente na maioria das frutas vermelhas: a cianidina-3-glucosídeo. Sugere-se que essa relação dos tempos de retenção ( $\alpha$ ) seria a forma de identificar as diferentes antocianinas. Dessa forma, a identificação de antocianinas em frutas é facilitada consideravelmente, minimizando o problema da falta de padrões. Goiffon *et al.* determinaram o valor de  $\alpha$  para 40 antocianinas e antocianidinas utilizando 2 tipos de eluentes, enquanto que na maioria dos trabalhos descritos na literatura para identificação de antocianinas cita-se apenas um tipo de fase móvel.

A espectrofotometria UV-Vis é uma ferramenta auxiliar muito importante nas análises de antocianinas, principalmente quando acopladas com técnicas como a CLAE. As antocianinas apresentam diferentes perfis espectrais dependendo do pH, devido à predominância de diferentes estruturas em cada meio, como pode ser observado na Figura 4. Segundo alguns pesquisadores, como Francis,<sup>20</sup> quando a antocianidina e o(s) açúcar(es) é(são) conhecido(s), os dados espectrais podem ser ferramentas muito úteis na determinação da posição da ligação glicosídica. Este autor afirma que quando uma antocianina possui uma molécula de açúcar ligada ao carbono da posição 5, em meio ácido, observa-se um ombro na banda de absorção em 440 nm, além da banda do cátion flavílico em 520 nm. No entanto, mesmo servindo como ferramenta complementar para as análises qualitativas, quando utilizada em conjunto com análises por CLAE, a espectrofotometria UV-Vis, quando aplicada sozinha, apresenta maior utilidade em análises quantitativas.

Uma aplicação interessante da espectrofotometria UV-Vis no campo da identificação de antocianinas foi realizada em 2000 por Cabrita *et al.*,<sup>36</sup> onde foi proposta a identificação de grupos de antocianinas. Os autores relatam que as antocianinas podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com o perfil da curva obtida no comprimento de onda de máxima absorção de cada antocianina em função do pH. As curvas características de cada grupo podem ser explicadas pelos grupos substituintes no anel B da estrutura fundamental das antocianinas (Figura 2a). O número de substituintes oxigenados (hidroxi ou metoxi) no anel B causa um efeito batocrômico em valores de pH relativamente baixos, bem como para valores de pH altos. Assim, os grupos hidroxi e metoxi apresentam efeitos similares sobre as formas cromóforas azuladas presentes no equilíbrio. Nesse trabalho foram utilizados morangos, arroz, *Abies koreana* e blueberries como fontes de antocianinas, sendo que os mesmos passaram por processos de purificação e isolamento com CLAE de fase-reversa para posterior identificação utilizando-se ressonância magnética nuclear, comprovando que a espectrofotometria é uma excelente ferramenta complementar nas análises de antocianinas. Mesmo apresentando como vantagem custo relativamente baixo quando comparada com as técnicas mais avançadas, devido à grande quantidade de substâncias presentes em um extrato vegetal, não se pode confiavelmente afirmar sobre a estrutura de um pigmento apenas pela observação do espectro UV-Vis obtido.

Uma técnica que pode disponibilizar excelentes informações sobre a fórmula molecular de uma antocianina é a espectrometria de massas (MS). A espectrometria de massas, em sua essência, consiste na geração de íons pela fragmentação das moléculas da amostra e a detecção dos fragmentos é feita de acordo com a mas-

sa.<sup>15</sup> Os íons positivamente carregados produzidos são acelerados em um campo magnético que dispersa e permite medidas relativas de íons de diferentes razões massa/carga. O resultado da medida da abundância dos íons *versus* a massa constitui o espectro de massas, que consiste de uma série de linhas variando em intensidade em diferentes unidades de massa. Para a análise de antocianinas, geralmente empregam-se fontes de bombardeamento rápido de átomos<sup>37</sup> (*Fast Atom Bombardment, FAB*) e spray de elétrons (*Electrospray Ionization, ESI*). Uma característica importante da ESI está no fato de que as amostras devem ser introduzidas na forma de solução, tornando possível o acoplamento com muitas técnicas de separação, como a CLAE. A vantagem da técnica de espectrometria de massas está na capacidade de indicar a fórmula molecular exata da substância sem a necessidade de grandes quantidades de amostra, pois a técnica pode trabalhar com quantidades a nível traço.<sup>15</sup> No entanto, deve-se tomar cuidado com a presença de isômeros, o que provavelmente é seu fator limitante. A melhor forma de prevenção contra este erro deve estar nas etapas de purificação e isolamento, após detecção da presença de antocianinas no extrato.

Com a possibilidade de utilização de equipamentos avançados que fornecem informações tais como espectro de massa e RMN de carbono e prótons, o procedimento para a elucidação da estrutura de uma antocianina deve, em sua primeira etapa, levar ao reconhecimento da fórmula molecular, pois assim se pode ter uma idéia geral da molécula (isto é, o número e o tipo de átomos). A obtenção da fórmula molecular começa com a localização do pico do íon molecular obtido pelo espectro de massas. A partir deste ponto os espectros de RMN podem trazer as informações sobre a localização dos átomos de carbono e hidrogênio na estrutura da molécula. Observa-se que a confiabilidade dos resultados estará relacionada com a pureza atingida.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) pode disponibilizar informações para a determinação da estrutura de um composto orgânico, através da medida dos momentos magnéticos de átomos de carbono e hidrogênio.<sup>15</sup> A espectroscopia RMN é basicamente uma outra forma de espectroscopia de absorção, onde, sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências em uma frequência regida pelas características estruturais da molécula, sendo que a absorção é função de determinados núcleos da molécula.<sup>38-40</sup>

A técnica de espectroscopia de RMN mais eficiente para a elucidação estrutural é a RMN em duas dimensões. As duas dimensões referidas no espectro 2-D são os eixos de frequência, onde o experimento exige duas transformadas de Fourier perpendiculares entre si em dois eixos de tempo independentes, que levam a dois eixos de frequência ortogonais.<sup>39</sup> Uma das maiores vantagens de se trabalhar com RMN em comparação com técnicas como, por exemplo, a CLAE na identificação de antocianinas está no fato da não necessidade de padrões. No entanto, as dificuldades para este método estão na complexidade dos espectros e na influência do solvente.

O acoplamento de diferentes técnicas instrumentais constituindo os instrumentos hifenados ou técnicas de segunda ordem, tais como a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas ou detecção na região UV-Vis através de um sistema de arranjo de diodos, vem sendo cada vez mais aplicado em laboratórios de química analítica por permitir a obtenção de informações adicionais provenientes da correlação de diferentes respostas, como por exemplo, um espectro de absorção e um perfil cromatográfico, obtidos simultaneamente de uma mesma amostra.<sup>41,42</sup> O uso de técnicas hifenadas, combinando separação e identificação das antocianinas, é comum. Desta forma, a identificação das antocianinas fica facilitada pela quantidade de informações que pode ser disponibilizada

por estes equipamentos. Isto se deve à alta seletividade, melhora no limite de determinação e redução no tempo de análise.<sup>5</sup>

O rápido e contínuo desenvolvimento na instrumentação nos últimos anos, em particular aqueles que envolvem espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, tem proporcionado considerável ímpeto para a elucidação estrutural em todos os campos da química de produtos naturais. Para as antocianinas, isto significa que estruturas extremamente complexas podem ser determinadas. Em geral, essas determinações não requerem derivatizações contínuas ou degradações, porém, o uso e a manutenção de equipamentos mais sofisticados eleva significativamente o custo, limitando desta forma seus usuários e aplicações.

Uma das maiores dificuldades da resolução espectrofotométrica de sistemas químicos é a estimativa do número, da concentração e dos espectros das espécies envolvidas no sistema. Diferentes técnicas estatísticas multivariadas têm sido utilizadas para se encontrar a melhor metodologia para extrair informação destes sistemas, com o objetivo de identificar as espécies presentes e determinar qualitativamente e quantitativamente as concentrações de algumas ou todas elas. Essas técnicas são conhecidas como métodos quimiométricos. A aplicabilidade de cada metodologia depende do conjunto de dados (informação experimental) submetidos à análise.<sup>43</sup> Em pesquisas recentes, foram utilizados métodos quimiométricos associados a dados espectrofotométricos para auxiliar na identificação de antocianinas extraídas de flores do gênero *Hibiscus*.<sup>44-46</sup> Nestes trabalhos, observa-se que com a aplicação de métodos quimiométricos em dados espectrofotométricos, foi possível identificar antocianinas sem a utilização de técnicas muito dispendiosas: identificaram-se equilíbrios entre diferentes formas de antocianinas, onde os valores calculados para as constantes de equilíbrio se encontram em excelente concordância com valores sugeridos pela literatura.

## CONCLUSÕES

No geral, observa-se que uma das maiores dificuldades na identificação das antocianinas individuais é a falta de padrões, e que a escolha do método a ser utilizado depende do objetivo da análise. Para a detecção da presença de antocianinas em um vegetal, um simples teste utilizando-se cromatografia em papel pode ser suficiente. Métodos ópticos como UV-Vis são ferramentas complementares muito úteis para a caracterização de antocianinas. Identificações de antocianinas individuais exigem métodos mais avançados como CLAE, espectroscopia RMN e espectrometria de massas. A combinação destas técnicas pode trazer informações suficientes para a completa elucidação da estrutura de uma antocianina, no entanto, devem-se tomar os devidos cuidados com análise de isótopos no caso da MS, na escolha do solvente em RMN, além de um cuidado especial na etapa de separação e isolamento, que pode influenciar em todo o resultado final.

De acordo com as pesquisas realizadas até hoje, fica claro que não existe um critério definido para a caracterização de novas antocianinas presentes em novas plantas.

## AGRADECIMENTOS

P. H. Março agradece à Fapesp (processo 04/09231-6) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Stringheta, P. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1991.
- Ikan, R.; *Natural products – A laboratory guide*, Academic Press: London, 1991.
- Molnár-Perl, I.; Füzfa, Z.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1073*, 201.
- Harborne, J. B. Em *Phytochemistry*; Miller, L. P., ed.; Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1973, vol. 2.
- Terci, D. B. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
- Hayashi, K. Em *The chemistry of flavonoid compounds*; Geissman, T. A., ed.; The MacMillan Company: New York, 1962, cap. 9.
- Brouillard, R. Em *Anthocyanins as food colors*; Markakis, P., ed.; Academic Press: New York, 1982, cap. 1.
- Timberlake, C. F.; Bridle, P. Em *The flavonoides*; Harborne, J. B., ed.; Academic Press: New York, 1975.
- Harborne, J. B.; *The flavonoids: advances in research since 1986*, Chapman and Hall: New York, 1<sup>st</sup> ed., 1994.
- Terci, D. B. L.; Rossi, A. V.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 685.
- Bobbio, P. A.; Bobbio, F. O.; *Química de processamento de alimentos*, Varela: São Paulo, 3<sup>a</sup> ed., 2001.
- Costa, C. T.; Horton, D.; Margolis, S. A.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 403.
- Soares, M. H. F. B.; Cavalheiro, E. T. G.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 408.
- Kim, D. O.; Heo, H. J.; Kim, Y. J.; Yang, H. S.; Lee, C. Y.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9921.
- Harborne, J. B.; *Phytochemical Methods – A guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman and Hall: New York, 3<sup>rd</sup> ed., 1998.
- Bogs, J.; Ebadi, A.; Mcdavid, D.; Robinson, S. O.; *Plant Physiol.* **2006**, *140*, 279.
- Ribéreau-Gayon, P. Em ref. 2, cap. 8.
- Zanatta, C. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
- Gervasio, A. P. G.; Lavorante, A. F.; Moraes, M. C. B.; Giné, M. F. G.; Miranda, C. E. S.; Carrilho, E.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 65.
- Francis, F. J. Em ref. 2, cap. 7.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Introdução a métodos cromatográficos*, 7<sup>a</sup> ed., Editora Unicamp: Campinas, 1997.
- Seikel, M. K. Em ref. 6, cap. 3.
- Seikel, M. K. Em *Biochemistry of phenolic compounds*; Harborne, J. B., ed.; Academic Press: London, 2<sup>nd</sup> ed., 1968.
- Lee, H. S.; Hong, V.; *J. Chromatogr. A* **1992**, *624*, 221.
- Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 129.
- Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. T.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 31.
- Sáenz-Lopez, R.; Fernández-Zurbano, P.; Tena, M. T.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *990*, 247.
- Salas, E.; Dueñas, M.; Schwartz, M.; Winterhalter, P.; Cheynier, V.; Fulcrand H.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4536.
- Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 338.
- Du, Q.; Jerz, G.; Winterhalter, P.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1045*, 59.
- Zanatta, C. F.; Cuevas, E.; Bobbio, F. O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A. Z.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 531.
- Calvo, D.; Sáenz-Lopez, R.; Fernández-Zurbano, P.; Tena, M. T.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *524*, 207.
- Sáenz-Lopez, R.; Fernández-Zurbano, P.; Tena, M. T.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1052*, 191.
- Bridle, P.; García.Viguera, C.; *Food Chem.* **1997**, *59*, 299.
- Goiffon, J. P.; Mouly, P. P.; Gaydou, E. M.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *382*, 39.
- Cabrita, L.; Fossen, T.; Andersen, Ø. M.; *Food Chem.* **2000**, *68*, 101.
- Fukui, Y.; Nomoto, K.; Iwashita, T.; Masuda, K.; Tanaka, Y.; Kusumi, T.; *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9661.
- Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 6<sup>a</sup> ed, Aguiar, P. F.; Alencastro R. B. (tradutores), LTC: Rio de Janeiro, 2000.
- Agrawal, P. K.; Markham, K. R. Em *Studies in Organic Chemistry 39: Carbon-13 NMR of flavonoids*; Agrawal, P. K., ed.; Elsevier: Amsterdam 1989.
- Košir, I. J.; Lapornik, B.; Andrenšek, S.; Wondra, A. G.; Vrhovšek, U.; Kidri, J.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 277.
- Sentellas, S.; Saurina, J.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *909*, 259.
- Gui, M.; Rutan, S. C.; Agbodjan, A.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3293.
- Scarmínio, I. S.; Ishikawa, D. N.; Barreto, W. J.; Paczkowski, E. L.; Arruda, I. C.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 590.
- Levi, M. A. B.; Scarmínio, I. S.; Poppi, R. J.; Trevisan, M. G.; *Talanta* **2004**, *62*, 299.
- Março, P. H.; Levi, M. A. B.; Scarmínio, I. S.; Poppi, R. J.; Trevisan, M. G.; *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 1523.
- Março, P. H.; Scarmínio, I. S.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 138.